

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2003-517888

(P2003-517888A)

(43) 公表日 平成15年6月3日 (2003.6.3)

(51) IntCl.⁷

A 61 L 27/00

識別記号

F I

A 61 L 27/00

ターミナル (参考)

G 4 C 0 8 1

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 40 頁)

(21) 出願番号 特願2001-546699(P2001-546699)
(86) (22) 出願日 平成12年12月20日 (2000.12.20)
(85) 翻訳文提出日 平成14年6月19日 (2002.6.19)
(86) 国際出願番号 PCT/BE00/00152
(87) 国際公開番号 WO01/045760
(87) 国際公開日 平成13年6月28日 (2001.6.28)
(31) 優先権主張番号 09/469,302
(32) 優先日 平成11年12月22日 (1999.12.22)
(33) 優先権主張国 米国 (US)
(31) 優先権主張番号 PCT/BE00/94
(32) 優先日 平成12年8月16日 (2000.8.16)
(33) 優先権主張国 ベルギー (BE)

(71) 出願人 ヘノゲン・ソシエテ・アノニム
ベルギー・ビー-6041ゴセリー・リュデブ
ロフエスールジエネエブラシエ12
(72) 発明者 フイリツパール, ピエール
ベルギー・ビー-1070ブリユツセル・アベ
ニユーシャノワーヌローゼ9
(72) 発明者 プラスール, ミシエル
ベルギー・ビー-1082ブリユツセル・アベ
ニユーデフレベケ15
(74) 代理人 弁理士 小田島 平吉
Fターム (参考) 4C081 AB04 BA12 CD18 CD28 CD31
DA12 EA02

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 骨産生製品

(57) 【要約】

骨産生製品は、少なくとも1種類のリン脂質存在下でトロンピンを産生する組み換え化合物を含む血小板濃厚血漿の凝固マトリックス及び、マトリックスに分散された、骨の形成を誘発するために有効量のカルシウム含有化合物を含んで成る。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 密封材の調製法であって、そこで、フィブリノーゲン含有溶液が、少なくとも1種のリン脂質の存在下でトロンビンを生産するための組み換え化合物、少なくとも1種のバッファー及び少なくとも1種の抗生物質と接触される方法。

【請求項2】 フィブリノーゲン含有溶液を、少なくとも1種のリン脂質の存在下でトロンビンを生産するための組み換え化合物、少なくとも1種の抗生物質及び、ゲルの形成中、接触されたフィブリノーゲン溶液のpHが6と8の間、好都合には7と7.5の間に維持されるように、有効量の少なくとも1種のバッファーと接触させることにより、ゲルが形成される、請求項1の方法。

【請求項3】 1種もしくは複数の抗生物質及び1種もしくは複数のバッファー剤及び恐らくは、トロンビン生産用組み換え化合物及び恐らくは、リン脂質を含むバッファー溶液が調製され、前記バッファー溶液が6と8の間、好ましくは7と7.5の間から成るpHをもち、そしてフィブリノーゲン含有溶液が前記バッファー溶液と接触される、請求項2の方法。

【請求項4】 トロンビン生産用組み換え化合物が組み換えトロンボプラスチンである、請求項1～3のいずれかの方法。

【請求項5】 フィブリノーゲン含有溶液が、少なくとも2種の異なるリン脂質の存在下でトロンビン生産用組み換え化合物と接触される、請求項1～4のいずれかの方法。

【請求項6】 フィブリノーゲン含有溶液が、ホスファチジルセリン、その誘導体、少なくとも1種の脂肪酸側鎖をもつホスファチジルセリン、ホスファチジルコリン、その誘導体、及び少なくとも1種の脂肪酸側鎖をもつホスファチジルコリン、からなる群から選択された少なくとも1種のリン脂質、好ましくは前記の群から選択された少なくとも2種のリン脂質の存在下で、トロンビン生産用組み換え化合物と接触される、請求項1～5のいずれかの方法。

【請求項7】 ホスファチジルコリンの脂肪酸側鎖が、少なくとも1種の二重結合及び6～24炭素原子、好ましくは16～18炭素原子をもつ脂肪酸鎖から成る群から選択される、請求項6の方法。

【請求項8】 血小板濃厚血漿が、少なくとも1種類のリン脂質及びバッファ剤の存在下でトロンビン産生用組み換え化合物と接触される、請求項1～7のいずれかの方法。

【請求項9】 血小板濃厚血漿が1マイクロリッター当たり、1, 500, 000～2, 000, 000個の血小板濃度をもつ、請求項8の方法。

【請求項10】 血小板濃厚血漿が1マイクロリッター当たり1, 500, 000～2, 000, 000個の血小板濃度を持ち、他方、ゲル化期間に、pHを6と8の間、好都合には7と7.5の間に調整するために有効量の1種もしくは複数のバッファ剤の存在下で、1マイクロリッター当たり0.05～0.4 μ gの乾燥形態のトロンボプラスチン及び1マイクロリッター当たり0.05～4 μ gの1種もしくは複数の抗生物質が、血小板濃厚血漿と接触される、請求項8または9の方法。

【請求項11】 請求項1～10のいずれかに記載の密封材の調製用キットであって、

- フィブリノーゲン含有物質、好ましくはフィブリノーゲン含有溶液を含む第1のバイアル、
 - トロンビン産生用組み換え化合物、好ましくは前記組み換え化合物を含む溶液を含む第2のバイアル、
 - 恐らくは、フィブリノーゲン含有溶液及び／またはトロンビン産生用組み換え化合物を含む溶液の調製のための、第1のバイアル及び／または第2のバイアルに添加されるべき溶液を含む第3のバイアル、
- を含んで成り、そこで、

第1のバイアル及び／または第2のバイアル及び／または第3のバイアルが少なくとも1種類のリン脂質、好ましくは少なくとも2種の異なるリン脂質を含み、そして

第1のバイアル及び／または第2のバイアル及び／または第3のバイアル、好ましくは第2または第3のバイアルが少なくとも1種類の抗生物質を含む、キット。

【請求項12】 第1のバイアル及び／または第2のバイアル及び／または

第3のバイアルが少なくとも1種類のバッファー剤を含む、請求項11のキット

。【請求項13】 第2のバイアルが少なくとも1種のリン脂質、少なくとも1種のバッファー剤及び少なくとも1種の抗生物質を含む、請求項12のキット

。【請求項14】 第1のバイアルが乾燥形態のフィブリノーゲン含有物質を含み、他方、第2のバイアルが乾燥形態の、トロンビン産生用組み換え化合物を含む、請求項11のキット。

【請求項15】 少なくとも1種のリン脂質の存在下でトロンビン産生用組み換え化合物を含む血小板濃厚血漿の凝固マトリックス並びに骨の形成を誘発するために前記マトリックス中に分散された有効量のカルシウム含有化合物を含んで成る、骨産生製品。

【請求項16】 カルシウム含有化合物が、骨粒子、カルシウム含有添加剤との骨粒子の混合物から成る群から選択される、請求項15の骨産生製品。

【請求項17】 トロンビン産生用組み換え化合物が組み換えトロンボプラスチンである請求項15の骨産生製品。

【請求項18】 少なくとも2種の異なるリン脂質を更に含んで成る、請求項15の骨産生製品。

【請求項19】 トロンビン産生用組み換え化合物がリン脂質と組み合わせられている、請求項15の骨産生製品。

【請求項20】 トロンビン産生用組み換え化合物が、ホスファチジルセリン、その誘導体、少なくとも1種の脂肪酸側鎖をもつホスファチジルセリン、ホスファチジルコリン、その誘導体、及び少なくとも1種の脂肪酸側鎖をもつホスファチジルコリン及びそれらの混合物、からなる群から選択された少なくとも1種のリン脂質と組み合わせられている、請求項15の骨産生製品。

【請求項21】 トロンビン産生用組み換え化合物が、ホスファチジルセリン、その誘導体、少なくとも1種の脂肪酸側鎖をもつホスファチジルセリン、ホスファチジルコリン、その誘導体、及び少なくとも1種の脂肪酸側鎖をもつホスファチジルコリン及びそれらの混合物、からなる群から選択された少なくとも1

種のリン脂質と組み合わせられ、前記脂肪酸側鎖が少なくとも1種の二重結合及び6～24炭素原子をもつ脂肪酸鎖から成る群から選択される、請求項15の骨產生製品。

【請求項22】 トロンビン產生用組み換え化合物が、ホスファチジルセリン、その誘導体、少なくとも1種の脂肪酸側鎖をもつホスファチジルセリン、ホスファチジルコリン、その誘導体、及び少なくとも1種の脂肪酸側鎖をもつホスファチジルコリン及びそれらの混合物、からなる群から選択された少なくとも1種のリン脂質と組み合わせられ、前記脂肪酸側鎖が少なくとも1種の二重結合及び16～18炭素原子をもつ脂肪酸鎖から成る群から選択される、請求項15の骨產生製品。

【請求項23】 トロンビン產生用組み換え化合物が、少なくとも2種のリン脂質の混合物と組み合わせられ、そこで、第1のリン脂質が、ホスファチジルセリン、その誘導体、少なくとも1種の脂肪酸側鎖をもつホスファチジルセリン及びそれらの混合物から成る群から選択され、少なくとも1種の脂肪酸側鎖をもつホスファチジルセリンの脂肪酸側鎖が、少なくとも1種の二重結合及び6～24炭素原子をもつ脂肪酸鎖から成る群から選択され、他方、第2のリン脂質が、ホスファチジルコリン、その誘導体、及び少なくとも1種の脂肪酸側鎖をもつホスファチジルコリン及びそれらの混合物、からなる群から選択され、少なくとも1種の脂肪酸側鎖をもつホスファチジルコリンの脂肪酸側鎖が、少なくとも1種の二重結合及び6～24炭素原子をもつ脂肪酸鎖から成る群から選択される、請求項15の骨產生製品。

【請求項24】 カルシウム含有化合物が、骨粒子、カルシウム含有添加剤との骨粒子の混合物、から成る群から選択され、そして骨粒子が、脳顔面頭蓋骨粒子、腸骨粒子及びそれらの混合物から成る群から選択された骨粒子である、請求項15の骨產生製品。

【請求項25】 カルシウム含有化合物が、骨粒子、骨粒子のカルシウム含有添加剤との混合物から成る群から選択され、そして骨粒子が非変性骨の粒子である、請求項15の骨產生製品。

【請求項26】 骨粒子が0.5mmと5mmの間を含んで成る平均粒度を

もつ、請求項15の骨産生製品。

【請求項27】 カルシウム含有化合物が骨粒子、カルシウム含有添加剤との骨粒子の混合物から成る群から選択された、請求項15の骨産生製品であって、15%～50容量%の骨粒子を含んで成る製品。

【請求項28】 凝固マトリックスがマトリックス形成剤1マイクロリッター当たり1,500,000～2,000,000個の血小板濃度をもつ、血小板濃厚血漿の凝固マトリックスである、請求項15の骨産生製品。

【請求項29】 凝固マトリックスが、マトリックス形成剤1マイクロリッター当たり1,500,000～2,000,000個の血小板濃度及び、マトリックス形成剤1マイクロリッター当たり0.05～0.4 μ gの乾燥形態のトロンボプラスチンを含む、血小板濃厚血漿の凝固マトリックスである、請求項15の骨産生製品。

【請求項30】 血小板濃厚血漿が患者の血漿から調製され、骨粒子が患者の骨から調製される、患者のための請求項15の骨産生用製品。

【請求項31】 凝固マトリックスが生物適合性フィルムと結合されている、請求項15の骨産生用製品。

【請求項32】 成長因子、成長因子をコードする遺伝子、カルシウム含有化合物、薬剤、脂肪酸、抗生物質、殺バクテリア剤、殺ウイルス剤、フィブリノーゲン、マトリックスの形成を誘導する化合物及びそれらの混合物から成る群のうちから選択された少なくとも1種の添加剤を更に含む、請求項15の骨産生製品。

【請求項33】 抗生物質として、抗破骨細胞作用をもつ少なくとも1種の抗生物質を含む、請求項32の骨産生製品。

【請求項34】 トロンビン産生用組み換え化合物を含む血小板濃厚血漿の凝固マトリックス及び、前記マトリックス中に分散された骨粒子を含んで成る、骨産生用製品の調製法であって、そこで、

一 実質的に均質な混合物が、組み換えトロンビン産生用化合物及びリン脂質を添加する時に、骨産生を誘発するために有効量のカルシウム含有化合物と血小板濃厚血漿を混合することにより調製され、

ー 組み換えトロンビン産生用化合物及びリン脂質が、血小板濃厚血漿から調製された混合物に添加、混合され、並びに

ー 組み換えトロンビン産生用化合物、リン脂質、血小板濃厚血漿及びカルシウム含有化合物の混合物が血小板濃厚血漿の凝固及びマトリックスの形成を確保するための条件下に維持される、

方法。

【請求項35】 カルシウム含有化合物が骨粒子、骨粒子のカルシウム含有添加剤との混合物から成る群から選択される、請求項34の方法。

【請求項36】 凝固が酸素の存在下で、実質的に攪拌せずに実施される、請求項34の方法。

【請求項37】 凝固のために使用されたトロンビン産生用組み換え化合物が組み換えトロンボプラスチンである、請求項34の方法。

【請求項38】 カルシウム含有化合物が骨粒子、骨粒子のカルシウム含有添加剤との混合物から成る群から選択され、そして少なくとも1種のリン脂質が組み換えトロンビン産生用化合物、血小板濃厚血漿及び骨粒子の混合物、並びに血小板濃厚血漿及び骨粒子の混合物、から成る群から選択された混合物に添加される、請求項34の方法。

【請求項39】 トロンビン産生用組み換え化合物がリン脂質と組み合わせられている、請求項34の方法。

【請求項40】 トロンビン産生用組み換え化合物が、ホスファチジルセリン、その誘導体、少なくとも1種の脂肪酸側鎖をもつホスファチジルセリン、ホスファチジルコリン、その誘導体、及び少なくとも1種の脂肪酸側鎖をもつホスファチジルコリン及びそれらの混合物、から成る群から選択された少なくとも1種のリン脂質と組み合わせられる、請求項34の方法。

【請求項41】 トロンビン産生用組み換え化合物が、ホスファチジルセリン、その誘導体、少なくとも1種の脂肪酸側鎖をもつホスファチジルセリン、ホスファチジルコリン、その誘導体、及び少なくとも1種の脂肪酸側鎖をもつホスファチジルコリン及びそれらの混合物、から成る群から選択された少なくとも1種のリン脂質と組み合わせられ、前記脂肪酸側鎖が少なくとも1種の二重結合及び

6～24炭素原子をもつ脂肪酸鎖から成る群から選択される、請求項34の方法。

【請求項42】 トロンビン産生用組み換え化合物が、ホスファチジルセリン、その誘導体、少なくとも1種の脂肪酸側鎖をもつホスファチジルセリン、ホスファチジルコリン、その誘導体、及び少なくとも1種の脂肪酸側鎖をもつホスファチジルコリン及びそれらの混合物、から成る群から選択された少なくとも1種のリン脂質と組み合わせられ、前記脂肪酸側鎖が少なくとも1種の二重結合及び16～18炭素原子をもつ脂肪酸鎖から成る群から選択される、請求項34の方法。

【請求項43】 トロンビン産生用組み換え化合物が、少なくとも2種のリン脂質の混合物と組み合わせられ、そこで、第1のリン脂質が、ホスファチジルセリン、その誘導体、少なくとも1種の脂肪酸側鎖をもつホスファチジルセリン及びそれらの混合物から成る群から選択され、少なくとも1種の脂肪酸側鎖をもつホスファチジルセリンの脂肪酸側鎖が、少なくとも1種の二重結合及び6～24炭素原子をもつ脂肪酸鎖から成る群から選択され、他方、第2のリン脂質が、ホスファチジルコリン、その誘導体、及び少なくとも1種の脂肪酸側鎖をもつホスファチジルコリン及びそれらの混合物、からなる群から選択され、少なくとも1種の脂肪酸側鎖をもつホスファチジルコリンの脂肪酸側鎖が、少なくとも1種の二重結合及び6～24炭素原子をもつ脂肪酸鎖から成る群から選択される、請求項34の方法。

【請求項44】 カルシウム含有化合物が骨粒子、カルシウム含有添加剤との骨粒子の混合物、から成る群から選択され、そして骨粒子が、脳顔面頭蓋骨粒子、腸骨粒子及びそれらの混合物から成る群から選択された骨粒子である、請求項34の方法。

【請求項45】 カルシウム含有化合物が、骨粒子、骨粒子のカルシウム含有添加剤との混合物から成る群から選択され、そして骨粒子が非変性骨の粒子である、請求項34の方法。

【請求項46】 カルシウム含有化合物が、骨粒子、骨粒子のカルシウム含有添加剤との混合物、から成る群から選択され、そして骨粒子が0.5mmと5

mmの間を含んで成る平均粒度をもつ、請求項34の方法。

【請求項47】 カルシウム含有化合物が骨粒子、カルシウム含有添加剤との骨粒子の混合物、から成る群から選択され、血小板濃厚血漿に添加された骨粒子の量が、血小板濃厚血漿及び骨粒子の混合物の約15%～50容量%に相当する、請求項34の方法。

【請求項48】 血小板濃厚血漿が、マトリックス形成剤1マイクロリッター当たり1,500,000～2,000,000個の血小板濃度をもつ、請求項34の方法。

【請求項49】 血小板濃厚血漿、骨粒子及び組み換えトロンビン産生用化合物の混合物が、骨粒子を含まない混合物1マイクロリッター当たり1,500,000～2,000,000個の血小板濃度をもち、骨粒子を含まない混合物1マイクロリッター当たり0.05～0.4 μ gの乾燥形態のトロンボプラスチンを含む、請求項34の方法。

【請求項50】 血小板濃厚血漿が患者の血漿、患者と組織適合性の血漿及びそれらの混合物から成る群から選択された血漿から調製され、カルシウム含有化合物が本質的に、患者の骨、患者と組織適合性の骨及びそれらの混合物から成る群から選択された少なくとも1種の骨から調製された骨粒子から成る、患者のための骨産生用製品の調製のための、請求項34の方法。

【請求項51】 血小板濃厚血漿及び、骨産生を誘発するために有効量のカルシウム含有化合物の混合物からの骨産生用製品の調製のための、少なくとも1種のリン脂質と混合た、トロンビンを産生するための組み換え化合物の使用。

【請求項52】 トロンビン産生用組み換え化合物、少なくとも1種のリン脂質及びカルシウム含有化合物を含む混合物で、カルシウム含有化合物／トロンビン産生用組み換え化合物からのカルシウムの重量比が0.5より大きい混合物。

【請求項53】 カルシウム含有化合物／トロンビン産生用組み換え化合物からのカルシウムの重量比が2を越える、請求項52の混合物。

【請求項54】 前記混合物が乾燥粉末の形態をもつ、請求項52の混合物。

【請求項55】 カルシウム含有化合物が塩、変性骨粒子及びそれらの混合物から成る群から選択される、請求項52の混合物。

【請求項56】 トロンビン産生用組み換え化合物、少なくとも1種のリン脂質及び少なくとも1種の抗生物質を含み、抗生物質／トロンビン産生用組み換え化合物の重量比が1より大きい混合物。

【請求項57】 抗生物質が抗破骨細胞作用をもつ抗生物質である、請求項56の混合物。

【請求項58】 抗生物質／トロンビン産生用組み換え化合物の重量比が5より大きい、請求項56の混合物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の分野)

骨産生(bone generating)製品は、少なくとも1種のリン脂質の存在下でトロンبینを産生するための組み換え化合物を含む血小板濃厚血漿の凝固マトリックス及び、骨の形成を誘発するために有効量の、マトリックス中に分散されたカルシウム含有化合物を含んで成る。

【0002】

(従来技術)

骨代替物または移植物の調製のために多数の研究が実施されてきた。

【0003】

骨代替物または移植物の調製のために、プリオンを破壊するために、ヒトの骨を化学薬品により処理することは周知である。そのように処理されたヒトの骨はその移植後の細胞の成長に適した多孔質のマトリックスとして働く。

【0004】

更に、コラーゲン含有物質から人工マトリックスまたはスポンジを調製し、前記マトリックスまたはスポンジを骨代替物として使用することも提唱されてきた。

【0005】

米国特許第5,733,545号明細書の実施例4は、血漿-軟膜被膜濃縮物及び粉碎乾燥骨を含む混合物からまたは血漿-軟膜被膜濃縮物及びCaCl₂からの血栓の調製を開示し、前記後者の化合物は混合物の凝固を確保するために使用される。前記実施例4において、粉碎乾燥骨を含む血漿-軟膜被膜濃縮物の錯体形成が、恐らくは、固形物の骨からのカルシウムの提供のためであることが述べられている。前記実施例において、トロンبینの使用が患者の合併症の一因であることが明らかに明記されている。

【0006】

しかし、血漿-軟膜被膜濃縮物及び粉碎乾燥骨を混合することにより得られた骨代替物は骨の産生には適さなかった。

【0007】

今や、骨産生用製品、すなわち、患者に移植されると急速な細胞転移増殖及び骨の産生を可能にする製品が見いだされた。骨の産生を得るためには、骨産生用製品を、血小板濃厚血漿、組み換えトロロンビン産生用製品、少なくとも1種のリン脂質及び、マトリックスに分散された、骨の形成を誘発するのに有効量のカルシウム含有化合物、を使用することにより調製しなければならない。リン脂質を伴うまたはその存在下の組み換え組織因子は組み換えトロロンビン産生用製品として、しかしまた、脱顆粒球血小板のための手段として、そして血小板中に存在する成長因子を放出するための手段として働く。好ましくは、カルシウム含有化合物の少なくとも一部分は骨粒子から製造される。例えば、カルシウム含有化合物の少なくとも30重量%、好ましくは少なくとも50重量%は骨粒子、好ましくは非変性骨粒子から製造される。本発明の骨産生用製品中の骨粒子の存在は、前記の骨粒子が、組織因子に骨を産生するように誘導するための成長因子と同様に骨形態発生タンパク質を含むために、骨の産生を改善すると考えられる。患者に、本発明の骨産生用製品を移植することにより得られた優れた骨産生は、血小板濃厚血漿中に存在する様々な因子（成長因子、等）及び、1種もしくは複数のカルシウム含有化合物（好ましくは骨粒子）の存在によると推定される。組み換え組織因子の存在もまた好ましい。組み換え組織因子は、カルシウム含有化合物の存在下で骨の形成を誘発し、加速させるのに適した因子の、タンパク質含有マトリックスを誘発する。実質的に血小板濃厚血漿、骨粒子及び組み換えトロロンビン産生用化合物のみを使用する場合は、本発明の製品中に存在する異なる因子は、実質的に身体内におけるように（他方に対する1つの因子の比率が身体内における前記の比率に実質的に等しい）作用し、それにより骨の産生を改善すると推定される。

【0008】

（発明の簡単な説明）

本発明の骨産生製品はトロロンビン産生用組み換え化合物を含む血小板濃厚血漿の凝固マトリックスを含んで成り、前記マトリックスが少なくとも1種のリン脂質及びマトリックス中に分散された、骨を産生するのに有効量のカルシウム含有

化合物を含んで成る。好ましくは、カルシウム含有化合物は、恐らくは他のカルシウム含有化合物と混合された骨粒子である。好ましくは、カルシウム含有化合物の少なくとも30重量%、好都合には少なくとも50重量%が骨粒子から成る。カルシウム含有化合物の例は、 CaCl_2 、リン酸 β -トリカルシウム、骨粒子(変性骨)、骨粒子(非変性骨)、アパタイト、アスピジン、硫酸カルシウム、炭酸カルシウム、ヒドロキシアパタイト、ヒドロキシアパタイト(さんご礁からの)、グルコノ乳酸カルシウム、グルコン酸カルシウム、乳酸カルシウム、グルトニン酸カルシウム(calcium glutoniate)及びそれらの混合物、である。

【0009】

好都合には、トロンビン産生用組み換え化合物は組み換えトロンボプラスチンである。好ましくは、本発明の骨産生用製品は2種以上の異なるリン脂質を含んで成る。

【0010】

好都合な態様に従うと、トロンビン産生用組み換え化合物は1種の、好ましくは少なくとも2種の異なるリン脂質と組み合わせられる。

【0011】

好ましい態様に従うと、トロンビン産生用組み換え化合物は、ホスファチジルセリン、その誘導体、少なくとも1種の脂肪酸側鎖をもつホスファチジルセリン、ホスファチジルコリン、その誘導体、及び少なくとも1種の脂肪酸側鎖をもつホスファチジルコリン及びそれらの混合物から成る群から選択された1種のリン脂質と組み合わせられる。好ましくは、トロンビン産生用組み換え化合物は、ホスファチジルセリン、その誘導体、少なくとも1種の脂肪酸側鎖をもつホスファチジルセリン、ホスファチジルコリン、その誘導体、及び少なくとも1種の脂肪酸側鎖をもつホスファチジルコリン及びそれらの混合物から成る群から選択された1種のリン脂質と組み合わせられ、脂肪酸側鎖が、少なくとも1種の二重結合及び、6~24炭素原子、最も好ましくは16~18炭素原子をもつ脂肪酸鎖から成る群から選択される。

【0012】

最も好ましい態様に従うと、トロンビン産生用組み換え化合物は少なくとも2

個のリン脂質の混合物と組み合わせられ、その第1のリン脂質は、ホスファチジルセリン、その誘導体、少なくとも1種の脂肪酸側鎖をもつホスファチジルセリン及びそれらの混合物から成る群から選択され、少なくとも1種の脂肪酸側鎖をもつホスファチジルセリンの脂肪酸側鎖は、少なくとも1種の二重結合及び6～24炭素原子、好ましくは16～18炭素原子をもつ脂肪酸鎖から成る群から選択され、他方、第2のリン脂質はホスファチジルコリン、その誘導体、及び少なくとも1種の脂肪酸側鎖をもつホスファチジルコリン及びそれらの混合物から成る群から選択され、少なくとも1種の脂肪酸側鎖をもつホスファチジルコリンの脂肪酸側鎖が、少なくとも1種の二重結合及び6～24炭素原子をもつ脂肪酸鎖から成る群から選択される。

【0013】

本発明の骨産生用製品において、骨粒子は好ましくは、脳顔面頭蓋骨粒子、腸骨粒子及びそれらの混合物から成る群から選択された骨粒子である。好ましくは、骨粒子は非変性骨の粒子である。好都合には、骨粒子は0.5mmと5mmの間を含んで成り、好ましくは0.5と3mmの間を含んで成り、最も好ましくは約1mm（重量平均）を含んで成る平均粒度をもつ。骨粒子は例えば、0.5mmと5mmの間を含んで成り、好ましくは0.5と3mm、最も好ましくは約1mm（重量平均）を含んで成る平均粒度をもつチップまたはフレークの形態をもつ。可能な態様に従うと、骨粒子は変性骨粒子（例えば、プリオンを除去するために、1種もしくは複数の化学薬品により、放射線、等により処理してある骨を粉碎することにより調製された骨粒子）並びに非変性骨粒子の混合物から成る。幾らかの変性骨粒子を使用する場合は、変性骨の前記の粒子は、前記の変性骨粒子が製品へ幾らかのカルシウムを添加するために使用されるので、0.5mmより小さい粒度をもつことができる。

【0014】

本発明の骨産生製品は例えば、5%～50容量%の骨粒子、好都合には10～40%、好ましくは20～30容量%の骨粒子を含んで成る。骨粒子は好ましくは、本発明の骨産生製品中に存在するカルシウム含有化合物の90重量%より多くを形成する。

【0015】

本発明の骨産生製品の好都合な態様に従うと、凝固マトリックスはマトリックス形成物剤1マイクロリッター当たり1,500,000~2,000,000個の血小板濃度、及び、好ましくは、マトリックス形成剤1マイクロリッター当たり0.05~0.4 μ gの乾燥形態のトロンボプラスチンを含む血小板濃厚血漿の凝固マトリックスである。血小板濃度は37℃で血小板の有効性を保証するために採用された濃度である。

【0016】

併発症をできるだけ回避し、患者の天然の骨上に産生される骨の移植体をするだけ改善するために、使用される血小板濃厚血漿は患者の血漿からそして／または患者と組織適合性(hystocompatible)の血漿から(すなわち免疫学的組織適合性)調製され、他方、骨粒子は患者の骨からそして／または患者と組織適合性(すなわち免疫学的組織適合性)の1種もしくは複数の骨から調製される。

【0017】

本発明の骨産生用製品は恐らく、成長因子(上科BTGF及び、BMP-1のようなBMPの科、等)、遺伝子コードBMP及び／またはBTGF、立体因子、カルシウム含有化合物、薬剤、脂肪酸、抗生物質もしくは抗生物質の混合物(好ましくはテトラサイクリン群の抗生物質、Vibramaycin^(R)、Doxycycline^(R)、ミノサイクリン、minocin^(R)(Wyeth-Lederlee)のような抗破骨細胞作用をもつ1種もしくは複数の化合物、及びマクロライド、ペニシリンに基づいた化合物、等のようなもう1種の、1種もしくは複数の抗生物質を含む抗破骨細胞作用をもつ1種もしくは複数の化合物の混合物)、殺バクテリア剤、殺ウイルス剤、フィブリノーゲン、マトリックスの形成を誘発する化合物、バッファー、生理学的pH、等において双イオン性バッファー系のような、更なる成分または添加剤、並びに前記化合物または添加剤の混合物、を含むことができる。

【0018】

好ましい態様の詳細に従うと、骨産生用製品は、0.001~10重量%の1種もしくは複数の抗生物質(その乾燥形態で計算された)、好都合には0.01~5重量%、好ましくは0.02~1%、例えば0.05~0.4重量%を含む

。抗生物質は好都合には、抗破骨細胞作用をもつ抗生物質（より具体的にはテトラサイクリン群の抗生物質、Vibramycin^(R)、Doxycycline^(R)、ミノサイクリン、minocin^(R) (Wyeth-Lederle)）、抗破骨細胞作用をもつ抗生物質の混合物、及び1種以上の、1種もしくは複数の他の抗生物質（好ましくは、マクロライド、ペニシリンに基づいた化合物、等及びそれらの混合物）との抗破骨細胞作用をもつ1種以上の抗生物質の混合物、から成る群から選択される。

【0019】

そのゲル化の前に、骨産生用製品は、好都合には、37℃で測定された、生理学的pH、例えば6.5と8の間、好ましくは、約7～7.5のpHを含んで成るpHに実質的に等しいpHをもつ。

【0020】

本発明はまた、トロンビン産生用組み換え化合物を含む血小板濃厚血漿の凝固マトリックス、及び、前記マトリックス中に分散された骨粒子を含んで成る骨産生用製品の調製法に関し、そこで、

- 実質的に均質な混合物が、組み換えトロンビン産生用化合物及びリン脂質を混合物に添加する時に、骨産生を誘発するために有効量の1種類もしくは複数のカルシウム含有化合物と、血小板濃厚血漿を混合することにより形成され、
- 組み換えトロンビン産生用化合物及び少なくとも1種のリン脂質が、骨粒子及び血小板濃厚血漿の混合物に添加、混合され、並びに
- 組み換えトロンビン産生用化合物、血小板濃厚血漿、リン脂質及び骨粒子の混合物が、血小板濃厚血漿の凝固及び骨産生用マトリックスの形成を確保するための条件下に維持される。

【0021】

好ましくは凝固は酸素の存在下で、実質的に攪拌せずに実施される。前記凝固は最も好ましくは、35℃と40℃の間を含んで成る温度で、より具体的には、約37℃の温度で実施される。

【0022】

本発明の方法において、凝固のために使用されたトロンビン産生用組み換え化合物は好都合には、組み換えトロンボプラスチンである。

【0023】

好都合には、少なくとも2種の異なるリン脂質を、組み換えトロンビン産生用化合物、血小板濃厚血漿及び骨粒子の混合物、並びに血小板濃厚血漿及び骨粒子の混合物、から成る群から選択された混合物に添加し、そこで前記添加が好ましくは、組み換えトロンビン産生用化合物を添加する時に実施される。

【0024】

本発明の方法において、組み換えトロンビン産生用化合物は好都合には、リン脂質、好ましくは複数のリン脂質と組み合わせられ、そこで1種もしくは複数のリン脂質と組み合わせられた前記化合物は好都合には、凍結乾燥ケーキ、粉末もしくは顆粒のような、凍結乾燥製品の形態をもつ。

【0025】

本発明の好ましい方法に従うと、トロンビン産生用組み換え化合物は、ホスファチジルセリン、その誘導体、少なくとも1種の脂肪酸側鎖をもつホスファチジルセリン、ホスファチジルコリン、その誘導体、及び少なくとも1種の脂肪酸側鎖をもつホスファチジルコリン及びそれらの混合物、からなる群から選択された少なくとも1種のリン脂質と組み合わせられ、そこで脂肪酸側鎖は好都合には、少なくとも1種の二重結合及び6～24炭素原子、好ましくは16～18炭素原子をもつ脂肪酸鎖から成る群から選択される。

【0026】

本方法の最も好ましい態様に従うと、トロンビン産生用組み換え化合物は少なくとも2種のリン脂質の混合物と組み合わせられ、第1のリン脂質はホスファチジルセリン、その誘導体、少なくとも1種の脂肪酸側鎖をもつホスファチジルセリン及びそれらの混合物から成る群から選択され、少なくとも1種の脂肪酸側鎖をもつホスファチジルセリンの脂肪酸側鎖は、少なくとも1種の二重結合及び6～24炭素原子、好ましくは16～18炭素原子をもつ脂肪酸鎖から成る群から選択され、他方第2のリン脂質は、ホスファチジルコリン、その誘導体、及び少なくとも1種の脂肪酸側鎖をもつホスファチジルコリン及びそれらの混合物、からなる群から選択され、少なくとも1種の脂肪酸側鎖をもつホスファチジルコリンの脂肪酸側鎖は、少なくとも1種の二重結合及び6～24炭素原子をもつ脂肪酸

鎖から成る群から選択される。

【0027】

好ましくは、1種もしくは複数のカルシウム含有化合物の少なくとも一部は、骨粒子、好都合には、脳顔面頭蓋骨粒子、腸骨粒子及びそれらの混合物から成る群から選択された骨粒子により形成される。骨粒子は好都合には、非変性骨の粒子である。前記骨粒子は恐らくは、非変性骨粒子及び変性骨粒子の混合物から成ることができる。骨粒子は好都合には、0.5mmと5mmの間を含んで成る、好ましくは0.5と3mmの間を含んで成る、最も好ましくは約1mmの平均（重量）粒度をもつ。

【0028】

本発明の方法において、血小板濃厚血漿に添加された骨粒子の量は例えば、血小板濃厚血漿及び骨粒子の混合物の約5%～50容量%、好都合には10～40容量%、好ましくは20%～30容量%に相当する。

【0029】

好都合には、本発明の方法に使用された血小板濃厚血漿はマトリックス形成剤1マイクロリッター当たり1,500,000～2,000,000個の血小板濃度をもつ。

【0030】

好ましくは、血小板濃厚血漿、骨粒子及び組み換えトロンビン産生用化合物の混合物は骨粒子を含まない混合物1マイクロリッター当たり1,500,000～2,000,000個の血小板濃度をもち、骨粒子を含まない混合物1マイクロリッター当たり乾燥形態のトロンボプラスチン0.05～0.4 μ gを含む。

【0031】

患者のための骨産生用製品の調製に適した本発明の好ましい方法に従うと、血小板濃厚血漿は、患者の血漿からそして／または、患者と組織適合性の血漿から調製され、そこで骨粒子は患者の骨からそして／または患者と組織適合性の骨から調製される。

【0032】

本発明の好ましい方法の詳細に従うと、血小板濃厚血漿の凝固は、少なくとも

1種の抗生物質の存在下で実施され、そして／または少なくとも1種の抗生物質が血小板濃厚血漿の凝固後に、混合物に添加される。抗生物質または抗生物質の混合物は恐らくは、その粉碎の前に骨粒子及び／または骨に、そして／またはトロンビン産生用組み換え化合物にそして／またはリン脂質に添加することができる。好ましくは、抗生物質もしくは抗生物質の混合物はトロンビン産生用組み換え化合物（トロンビンを産生する組み換え化合物）と、好ましくは組み換えトロンボプラスチンと混合される。

【0033】

好ましい態様の詳細に従うと、骨産生用製品に添加されたまたは血小板濃厚血漿の骨産生用製品の凝固中に使用された、1種もしくは複数の抗生物質の量は、1種もしくは複数の抗生物質を0.001～10重量%（その乾燥形態で計算された）、好都合には0.01%～5重量%、好ましくは0.02～1%、例えば0.05%～0.4重量%、より具体的には0.2～0.3%を含む。抗生物質は好都合には、抗破骨細胞作用をもつ抗生物質（より具体的にはテトラサイクリン群の抗生物質、Vibramycin^(R)、Doxycycline^(R)、ミノサイクリン、minocin^(R)（Wyeth-Lederle））、抗破骨細胞作用をもつ抗生物質の混合物、及び1種以上の1種もしくは複数の他の抗生物質（好ましくは、マクロライド、ペニシリンに基づいた化合物、等及びそれらの混合物）との抗破骨細胞作用をもつ1種以上の抗生物質の混合物、から成る群から選択される。

【0034】

最も好ましくは、少なくとも1種の抗生物質は、トロンビンを産生する組み換え化合物を添加する前に、しかし好都合には、トロンビンを産生する組み換え化合物を添加する時に、少なくとも血小板濃厚血漿及びカルシウム含有化合物を含む混合物に添加される。

【0035】

本発明はまた、血小板濃厚血漿及び骨産生を誘発するのに有効量のカルシウム含有化合物の混合物からの骨産生用製品の調製のために、少なくとも1種のリン脂質と混合した、トロンビン産生用組み換え化合物の使用に関する。

【0036】

本発明の更なる目的は、トロンビン産生用組み換え化合物、少なくとも1種のリン脂質及びカルシウム含有化合物を含む混合物であり、カルシウム含有化合物／トロンビン産生用組み換え化合物からのカルシウムの重量比は0.5より大きく、好都合には2より大きい。前記は好都合には、乾燥粉末の形態をもつ。カルシウム含有化合物は好ましくは、カルシウム含有塩、リン酸 β -トリカルシウム、変性骨の粒子及びそれらの混合物から成る群から選択される。

【0037】

本発明のまだ更なる目的は、トロンビン産生用組み換え化合物、少なくとも1種のリン脂質及び少なくとも1種の抗生物質を含む混合物である。混合物中に存在する1種もしくは複数の抗生物質（乾燥物質として）／混合物中に存在するトロンビン産生用組み換え化合物（乾燥物質として）の重量比は好都合には、1：1より大きく、好ましくは3：1より大きく、最も好ましくは5：1より大きく、そしてより具体的には10：1より大きい。例えば、前記の比率は5：1と50：1の間を含んで成り、より具体的には10：1と25：1の間を含んで成る。

【0038】

抗生物質は好都合には、抗破骨細胞作用をもつ抗生物質（より具体的にはテトラサイクリン群の抗生物質、Vibramaycine^(R)、Doxycycline^(R)、ミノサイクリン、minocin^(R) (Wyeth-Lederle)）、抗破骨細胞作用をもつ抗生物質の混合物、及び1種以上の、1種もしくは複数の他の抗生物質（好ましくは、マクロライド、ペニシリンに基づいた化合物、等及びそれらの混合物）との抗破骨細胞作用をもつ1種以上の抗生物質の混合物、から成る群から選択される。

【0039】

トロンビン産生組み換え化合物は好都合には、組み換えトロンボプラスチンである。

【0040】

本発明は更に、密閉材の調製法に関し、そこでフィブリノーゲン含有溶液が少なくとも1種のリン脂質の存在下でトロンビン産生用組み換え化合物と接触、好ましくは混合される。好都合には、トロンビン産生用組み換え化合物は組み換え

トロンボプラスチンである。

【0041】

好都合には、ゲルが、6と8の間、好都合には7と7.5の間に維持されたpHで形成されるように、少なくとも1種類のリン脂質、少なくとも1種類の抗生物質及び少なくとも有効量の1種類のバッファーの存在下で、トロンビン産生用組み換え化合物と、フィブリノーゲン含有溶液を接触させることにより、ゲルが形成される。

【0042】

好ましくは1種類もしくは複数の抗生物質及び1種類もしくは複数のバッファー剤を含むバッファー溶液を調製し、フィブリノーゲン含有溶液と接触させる。前記バッファー溶液のpHは好都合には、6と8の間、最も好ましくは7と7.5の間を含んで成る。バッファー溶液は恐らくは、しかし好都合には、1種類もしくは複数のトロンビン産生用組み換え化合物及び／または1種類もしくは複数のリン脂質を含むことができる。

【0043】

可能なバッファーは例えば、TRISバッファー、リンゲ溶液 (solution of Ringe)、重炭酸ナトリウム及びそれらの混合物である。

【0044】

好ましくは、フィブリノーゲン含有溶液は少なくとも2種の異なるリン脂質の存在下で、トロンビン産生用組み換え化合物と接触される。

【0045】

最も好ましくは、フィブリノーゲン含有溶液はホスファチジルセリン、その誘導体、少なくとも1種の脂肪酸側鎖をもつホスファチジルセリン、ホスファチジルコリン、その誘導体、及び、少なくとも1種の脂肪酸側鎖をもつホスファチジルコリンから成る群から選択された少なくとも1種のリン脂質、好ましくは、前記の群から選択された少なくとも2個のリン脂質の存在下で、トロンビン産生用組み換え化合物と接触される。ホスファチジルコリンの脂肪酸側鎖は好都合には、少なくとも1種の二重結合及び6～24炭素原子、好都合には16～18炭素原子をもつ脂肪酸鎖から成る群から選択される。

【0046】

密封材の形成の前に、混合溶液は好都合には、生理学的pH、例えば37℃で測定された、6.5と8の間を含んで成るpH、好ましくは約7~7.5、のpHに実質的に等しいpHをもつ。

【0047】

好都合には、血小板濃厚血漿はフィブリノーゲン含有溶液として使用される。血小板濃厚血漿は好都合には、1マイクロリッター当たり、1,500,000~2,000,000個の血小板の濃度をもつ。好ましくは、1マイクロリッター当たり1,500,000~2,000,000個の血小板濃度をもつ血小板濃厚血漿、1マイクロリッター当たり0.05~0.4 μ gの乾燥形態のトロンボプラスチン及び、1マイクロリッター当たり0.01~4 μ g（好都合には0.1~0.4 μ g、好ましくは0.2~0.3 μ g）の1種類もしくは複数の抗生物質（乾燥物質として）が、ゲル化期間に、6と8の間、好都合には7と7.5の間にpHを調整するために、有効量の1種類もしくは複数のバッファー剤の存在下で、血小板濃厚血漿と接触させられる。

【0048】

血小板濃厚血漿を使用する時には、できるだけ併発症を回避し、患者の密封材の移植体をできるだけ改善するために、使用された血小板濃厚血漿を患者の血漿からそして／または患者と組織適合性の血漿から（すなわち、免疫学的な組織適合性）調製される。

【0049】

フィブリノーゲン含有溶液、好ましくは血小板濃厚血漿は好都合には、少なくとも1種類の、好ましくは2種類の異なるリン脂質の存在下で、そして少なくとも1種類の抗生物質の存在下で、少なくとも1種類のトロンビン産生用組み換え化合物と接触させられる。

【0050】

好ましくは、フィブリノーゲン含有溶液、好ましくは血小板濃厚血漿は、少なくとも1種類のトロンビン産生用組み換え化合物及び少なくとも1種類、好ましくは2種類の異なるリン脂質を含む溶液と接触させられる。

【0051】

1種類以上の抗生物質を使用する時に、使用される1種類もしくは複数の抗生物質の量は好都合には、密封材が1種類もしくは複数の抗生物質を0.001～10重量%、好都合には0.01%～5重量%、好ましくは0.02～1%、最も好ましくは0.05～0.4%含むようなものである。密封材混合物中に存在する1種類もしくは複数の抗生物質／密封混合物中に使用されたトロンビン産生用組み換え化合物の重量比（乾燥物質として計算された）は好都合には、1：1より大きく、好ましくは3：1より大きく、最も好ましくは5：1より大きく、そしてより具体的には10：1より大きい。例えば、前記の比率は5：1と50：1の間、より具体的には10：1と25：1の間を含んで成る。

【0052】

抗生物質は好都合には、抗破骨細胞作用をもつ抗生物質（より具体的にはテトラサイクリン群の抗生物質、Vibramycin^(R)、Doxycycline^(R)、ミノサイクリン、minocin^(R) (Wyeth-Lederlee)）、抗破骨細胞作用をもつ抗生物質の混合物、並びに1種以上の1種もしくは複数の他の抗生物質（好ましくは、マクロライド、ペニシリンに基づいた化合物、等及びそれらの混合物）との抗破骨細胞作用をもつ1種以上の抗生物質の混合物、から成る群から選択される。

【0053】

本発明は更に、本発明に従う密封材の調製のためのキットに関し、前記キットは

- フィブリノーゲン含有物質、好ましくはフィブリノーゲン含有溶液を含む第1のバイアル、
 - トロンビン産生用組み換え化合物、好ましくは前記組み換え化合物を含む溶液、を含む第2のバイアル、
 - 恐らくは、フィブリノーゲン含有溶液及び／またはトロンビン産生用組み換え化合物を含む溶液の調製のための、第1のバイアル及び／または第2のバイアルに添加されるべき溶液を含む第3のバイアル、
- を含んで成り、そこで

第1のバイアル及び／または第2のバイアル及び／または第3のバイアルが少

なくとも1種のリン脂質、好ましくは少なくとも2種の異なるリン脂質を含み、そして

第1のバイアル及び／または第2のバイアル及び／または第3のバイアル（好ましくは第2及び／または第3のバイアル）が少なくとも1種類の抗生物質を含む。

【0054】

好都合には、第1のバイアル及び／または第2のバイアル及び／または第3のバイアルは少なくとも1種類のバッファー剤を含む。好ましくは、第2のバイアルが少なくとも1種類のリン脂質及び少なくとも1種類の抗生物質を含み、他方、第3のバイアルが1種類もしくは複数のバッファー剤を含む。最も好ましくは、第1のバイアルが乾燥形態のフィブリノーゲン含有物質を含み、他方、第2のバイアルが乾燥形態のトロンビン産生用組み換え化合物を含む。

【0055】

本発明の製品及び方法の詳細及び特徴は以下の実施例の説明から明白になるであろう。

【0056】

【実施例の説明】

前記の実施例の調製のために、以下の製品を使用した。

【0057】

PRP：骨移植体が移植された患者の血小板濃厚血漿。血漿の血小板濃度は血漿1マイクロリッター当たり1,800,000個の血小板であった。PRPは細菌学的抑制のために最大の割合の生命血小板を得るために白血球を除去するための既知の通常処理を受け、前記PRPは少なくとも5日間活性であった。その使用の前に、PRPを37℃で震盪し、前記の震盪はPRPを含む容器を震盪することにより実施した。

【0058】

トロンボプラスチン：使用したトロンボプラスチンは会社DADE AG(Duedingen, Switzerland)により商品名INNOVINとして販売されたトロンボプラスチンであった。トロンボプラスチンは合成リン脂質、すなわちホスファチジルセリン及びホ

スファチジルコリンと組み合わせて凍結された組み換えヒト組織因子であり、前記リン脂質は少なくとも1種類の脂肪酸側鎖をもち、脂肪酸側鎖は少なくとも1種の二重結合及び16~18炭素原子をもつ脂肪酸鎖からなる群から選択された。Innovinはプロトンピンを含まず、因子FVIIを含まず、そして因子FXを含まない。カルシウムはInnovin中に存在する。Innovinは試験の目的のための既知の製品である。Innovinはまた、生理学的pHにおいて幾らかのカルシウム、双イオン性バッファー系を含む。

【0059】

骨粒子：骨粒子は骨の移植が必要な患者の腸骨または脳顔面頭蓋骨から調製された。患者の新鮮な骨を1mmの平均直径をもつ骨のフレーク（骨ミール）に粉碎した。骨粒子をその調製の直後にPRPに添加する。

【0060】

水：使用した水は蒸留、滅菌の、発熱物質を含まない水である。

（実施例1）

前記実施例において、PRPの50mlを滅菌容器内に入れた。骨粒子10ml容量（脳顔面頭蓋から採取）をPRPに添加し、混合した。次に容器を酸素含有雰囲気中で滅菌条件下で37.5℃に加熱する（例えば、37.5℃の温度をもつ、水及び0.9%NaClを含む水浴を使用することにより）。

滅菌容器
PRP 50ml
骨粒子 10ml
37.5℃
10min
水

【0061】

Innovinの10mgを蒸留、滅菌そして発熱物質を含まない水2mlと混合した。水+Innovinの混合物を37.5℃の温度に維持したPRP+骨粒子混合物に添加した。

【0062】

攪拌せずに約10分後、容器内にゲルが形成し、前記ゲルは患者への移植に適した骨産生用製品である。

（実施例2）

Innovinの20mgを蒸留、滅菌そして発熱物質を含まない水の2mlと混合し、PRP+骨粒子混合物に添加したことを除いて、実施例1を繰り返した。

（実施例3~9）

前記実施例において、使用した試薬の量が異なることを除いて実施例1を繰り返した。

実施例	3	4	5	6	7	8	9
PRP (ml)	50	50	50	50	50	50	50
骨粒子 (ml)	10	10	15	40	30	25	50
脳顔面頭蓋							
Innovin (mg)	20	10	10	10	10	20	10
水 (ml)	2	2	2	2	2	4	4

(実施例10～19)

前記実施例においては、使用した試薬の量が異なることを除いて実施例1を繰り返した。

実施例	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
PRP (ml)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
骨粒子 (ml)				10	20	10	10	10	20	10
(脳顔面頭蓋)										
骨粒子 (ml)	10	20	40	10	10	20	10	10	20	30
(腸骨)										
Innovin (mg)	20	20	10	20	10	10	20	30	10	10
水 (ml)	2	2	4	2	2	2	2	2	4	4

ゲル形態をもつ前記実施例1～19の骨産生製品は患者に、例えば、より重症な上顎顔面アτροφイーを罹患するヒトの患者に容易に移植することができる。本発明の骨産生製品は骨の隙間に容易に充填することができ、形状を形成することができる。本発明の骨産生製品をより重症な上顎顔面アτροφイーを罹患するボランティアに使用した。洞リフト移植及び上顎顔面骨上の付加移植 (on lay graft) を実施した。これらの試験は、本発明の骨産生製品が適用された部分に骨の成長または骨の産生を示した。

(実施例20)

ヒトの骨を、プリオンを除去するために変性し、 γ -放射した。骨を0.2mmの平均(重量)粒度に粉碎した。乾燥後、骨粒子10gを乾燥INNOVIN10mm

gと乾燥混合して、トロンビン産生用組み換え化合物、リン脂質及び高濃度のカルシウム含有化合物の混合物を得た。

【0063】

次に、そのように調製した混合物を本発明の骨産生製品の調製のために使用した。

【0064】

INNOVIN 10mg + 変性骨粒子 10g の混合物を INNOVIN 10mg 単独の代わりに使用し、そして pasta を調製するように水量を調整するために、より大量の滅菌水 (5~10ml) を使用したことを除いて、実施例1の方法を繰り返した。

【0065】

(実施例21)

組み換えトロンボプラスチンを添加する前に、PRP及び骨粒子混合物 1ml 当たり Vibramycin^(R) 200 μ g を添加したことを除いて、実施例1を繰り返した。

(実施例22)

組み換えトロンボプラスチン添加の前に、PRP及び骨粒子混合物 1ml 当たりミノサイクリン (Minocin^(R)) 100 μ g を添加したことを除いて、実施例1を繰り返した。

(実施例23)

組み換えトロンボプラスチン添加の前に、PRP及び骨粒子混合物 1ml 当たりミノサイクリン (Minocin^(R)) 50 μ g を添加したことを除いて、実施例1を繰り返した。

(実施例24)

組み換えトロンボプラスチン添加の前に、PRP及び骨粒子混合物 1ml 当たりミノサイクリン (Minocin^(R)) 20 μ g を添加したことを除いて、実施例1を繰り返した。

(実施例25)

Innovin の 10mg を Vibramycin^(R) 100mg と混合した。Vibramycin の存在は Innovin の安定性及び作用を改善するように見える。

【0066】

Innovin-Vibramycin^(R)混合物をゲルの調製のために実施例1におけるように使用した。

(実施例26)

Innovinの10mgを水5mlと混合した。その後、Vibramycin100mgをInnovinの前記の水性混合物に添加した。次に、混合物を凍結乾燥して、Innovin及びVibramycinを含む粉末またはケーキを得た。

【0067】

次に、凍結乾燥製品を実施例25におけるように使用した。

【0068】

Innovinの調製方法におけるように、組み換えトロンボプラスチン及びリン脂質の水性混合物を凍結乾燥し、前記抗生物質（例えばVibramycin）を、その凍結乾燥の前に水性混合物に添加することができる（例えば、Innovinの調製法で実施したように、Ca⁺⁺、バッファー及び安定剤の混合物への添加の前及び／または後に）。

(実施例27～29)

Minocin^(R) (Wyeth-Lederlee) をVibramycin^(R)の代わりに使用したことを除いて、実施例24～26を繰り返した。

(実施例30～59)

American diagnostica Inc. の組み換え組織因子4500L/BをInnovinの代わりに使用したことを除いて、実施例1～29を繰り返した。American diagnostica Inc. の組み換え組織因子4500L/B2も使用することができる。

(実施例60)

密封材を、PRP50mlをInnovin10mg、Minocin^(R)100mg及び生理学的に許容できるバッファー（PRPとのその混合の前の水溶液に対して約7.2のpHをもつために十分な量の、例えば重炭酸ナトリウムの溶液）を含む水溶液2mlと混合することにより調製した。密封ゲルをそのようにして得た。

(実施例61)

PRP50mlを第1のシリンジの室内に入れ、他方Innovin10mg、Minoc

in^(R) 100mg 及び生理学的に許容できるバッファー（重炭酸ナトリウム）を含む水溶液 2ml を第2のシリンジの室内に入れた。傷に混合物を適用する前に、Innovin、Minocin及びバッファーとPRPを混合するために2本のシリンジをミキサーに、そしてミキサーにPRP 1ml 当たりInnovin溶液 0.04ml を連続的に配達するための手段に接続した。

(実施例62)

Innovin 10mg 及びVibramycin^(R) 200mg 及びバッファー剤（溶液のpHは約7.2である）を含む水溶液 10ml を使用し、手段がPRP 1ml 当たりInnovin-Vibramycin溶液 0.2ml をミキサーに連続的に配達することを除いて、実施例61を繰り返した。

(実施例63)

密封材の調製用キットで、前記キットは

- PRPを含む第1のバイアル
 - 乾燥形態のInnovin及びVibramycinを含む第2のバイアル、
 - Innovin-Vibramycinを含む溶液を再構成するための滅菌水及びバッファー
- （3種のバイアルと一緒に混合する時に、好ましくは第2及び第3のバイアルを最初に混合し、その混合物を第1のバイアルの内容物と混合物する時に、7.2のpHを確保するのに十分な量）を含む第3のバイアル、
- を含んで成る。

【0069】

好都合には、キットは更に、再構成されたInnovin-Vibramycin溶液とPRPを混合するための手段及び、例えば噴霧により傷の上に混合物を適用するための手段を含んで成る。

(実施例64)

特に前記実施例で調製された、本発明の密封組成物及びパスタ（骨産生製品）を人工骨、1種類以上の滅菌処理を受けた骨、をコートするために使用した。

【手続補正書】特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【提出日】平成14年1月17日(2002. 1. 17)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 密封材の調製法であって、そこで、フィブリノーゲン含有溶液が、少なくとも1種のリン脂質の存在下で、トロンビンを生産するための組み換え化合物、少なくとも1種のバッファー、抗破骨細胞作用をもつ少なくとも1種の抗生物質並びに、ゲルの形成期間に、接触されたフィブリノーゲン溶液のpHが6と8の間、好都合には7と7.5の間に維持されるように少なくとも有効量のバッファーと接触させられる方法。

【請求項2】 抗破骨細胞作用をもつ1種もしくは複数の抗生物質及び1種もしくは複数のバッファー剤及び恐らくは、トロンビン産生用組み換え化合物及び恐らくはリン脂質、を含むバッファー溶液が調製され、前記バッファー溶液が6と8の間、好ましくは7と7.5の間から成るpHをもち、そしてフィブリノーゲン含有溶液が前記バッファー溶液と接触させられる、請求項1の方法。

【請求項3】 トロンビン産生用組み換え化合物が組み換えトロンボプラスチンである、請求項1及び2のいずれかの方法。

【請求項4】 フィブリノーゲン含有溶液が少なくとも2種の異なるリン脂質の存在下でトロンビン産生用組み換え化合物と接触される、請求項1～3のいずれかの方法。

【請求項5】 血小板濃厚血漿が、少なくとも1種類のリン脂質の存在下でトロンビンを生産するための組み換え化合物、バッファー剤及び抗破骨細胞作用をもつ少なくとも1種の抗生物質並びに、ゲルの形成期間に、接触されたフィブリノーゲン溶液のpHが6と8の間、好都合には7と7.5の間に維持されるように有効量のバッファーと接触される、請求項1～4のいずれかの方法。

【請求項6】 血小板濃厚血漿が1マイクロリッター当たり、1,500,000~2,000,000個の血小板濃度をもつ、請求項5の方法。

【請求項7】 血小板濃厚血漿が1マイクロリッター当たり1,500,000~2,000,000個の血小板濃度を持ち、他方、ゲル化期間に、pHを6と8の間、好都合には7と7.5の間に調整するための有効量の1種もしくは複数のバッファー剤の存在下で、1マイクロリッター当たり乾燥形態の0.05~0.4 μ gのトロンボプラスチン及び1マイクロリッター当たり0.05~4 μ gの1種もしくは複数の抗生物質が、血小板濃厚血漿と接触される、請求項5または6の方法。

【請求項8】 — フィブリノーゲン含有物質、好ましくはフィブリノーゲン含有溶液を含む第1のバイアル、
— トロンビン産生用組み換え化合物、好ましくは前記組み換え化合物を含む溶液を含む第2のバイアル、
— 恐らくは、フィブリノーゲン含有溶液及び／またはトロンビン産生用組み換え化合物を含む溶液の調製のための、第1のバイアル及び／または第2のバイアルに添加されるべき溶液を含む第3のバイアル、
を含んで成り、そこで、

第1のバイアル及び／または第2のバイアル及び／または第3のバイアルが少なくとも1種類のリン脂質、好ましくは少なくとも2種の異なるリン脂質を含み、そして

第1のバイアル及び／または第2のバイアル及び／または第3のバイアル、好ましくは第2または第3のバイアルが、抗破骨細胞作用をもつ少なくとも1種の抗生物質を含みそして、

第1のバイアル及び／または第2のバイアル及び／または第3のバイアルが、ゲルの形成期間に、接触されたフィブリノーゲン溶液のpHが6と8の間、好都合には7と7.5の間に維持されるように有効量の少なくとも1種のバッファー剤を含んで成る、請求項1~7のいずれかに記載の密封材の調製のためのキット

。 【請求項9】 第2のバイアルが少なくとも1種のリン脂質、少なくとも1

種のバッファ剤及び少なくとも1種の抗生物質を含む、請求項8のキット。

【請求項10】 第1のバイアルが乾燥形態のフィブリノーゲン含有物質を含み、他方、第2のバイアルが乾燥形態の、トロンビン産生用組み換え化合物を含む、請求項9のキット。

【請求項11】 少なくとも1種のリン脂質の存在下でトロンビンを産生するための組み換え化合物を含む血小板濃厚血漿の凝固マトリックス、骨の形成を誘発するための前記マトリックス中に分散された有効量のカルシウム含有化合物及び抗破骨細胞作用をもつ少なくとも1種の抗生物質を含んで成る、骨産生製品。

【請求項12】 カルシウム含有化合物が骨粒子、カルシウム含有添加剤との骨粒子の混合物から成る群から選択される、請求項11の骨産生製品。

【請求項13】 トロンビン産生用組み換え化合物が組み換えトロンボプラスチンである請求項11の骨産生製品。

【請求項14】 少なくとも2種の異なるリン脂質を更に含んで成る、請求項11の骨産生製品。

【請求項15】 カルシウム含有化合物が骨粒子、カルシウム含有添加剤との骨粒子の混合物、から成る群から選択され、そして骨粒子が、脳顔面頭蓋骨粒子、腸骨粒子及びそれらの混合物から成る群から選択された骨粒子である、請求項11の骨産生製品。

【請求項16】 カルシウム含有化合物が、骨粒子、骨粒子のカルシウム含有添加剤との混合物から成る群から選択され、そして骨粒子が非変性骨粒子である、請求項11の骨産生製品。

【請求項17】 骨粒子が0.5mmと5mmの間を含んで成る平均粒度をもつ、請求項11の骨産生製品。

【請求項18】 カルシウム含有化合物が骨粒子、カルシウム含有添加剤との骨粒子の混合物から成る群から選択された、請求項11の骨産生製品であって、前記品が15%～50容量%の骨粒子を含んで成る製品。

【請求項19】 凝固マトリックスがマトリックス形成剤1マイクロリットル当たり1,500,000～2,000,000個の血小板濃度をもつ、血小

板濃厚血漿の凝固マトリックスである、請求項11の骨産生製品。

【請求項20】 凝固マトリックスが1マイクロリッター当たり1,500,000~2,000,000個の血小板濃度のマトリックス形成剤及び、マトリックス形成剤1マイクロリッター当たり0.05~0.4 μ gの乾燥形態のトロンボプラスチンを含む、血小板濃厚血漿の凝固マトリックスである、請求項11の骨産生製品。

【請求項21】 血小板濃厚血漿が患者の血漿から調製され、骨粒子が患者の骨から調製される、患者のための請求項11の骨産生製品。

【請求項22】 凝固マトリックスが生物適合性フィルムと結合されている、請求項11の骨産生製品。

【請求項23】 成長因子、成長因子をコードする遺伝子、カルシウム含有化合物、薬剤、脂肪酸、抗生物質、殺バクテリア剤、殺ウイルス剤、フィブリノーゲン、マトリックス形成を誘導する化合物及びそれらの混合物から成る群のうちから選択された少なくとも1種の添加剤を更に含む、請求項11の骨産生製品。

【請求項24】 トロンビン産生用組み換え化合物を含む血小板濃厚血漿の凝固マトリックス及び、前記マトリックス中に分散された骨粒子を含んで成る、骨産生製品の調製法であって、そこで、

- ー 実質的に均質な混合物が、組み換えトロンビン産生用化合物及びリン脂質を添加すると、骨産生を誘発するために有効量のカルシウム含有化合物と、血小板濃厚血漿を混合することにより調製され、
 - ー 組み換えトロンビン産生用化合物及びリン脂質が、血小板濃厚血漿から調製された混合物に添加、混合され、並びに
 - ー 組み換えトロンビン産生用化合物、リン脂質、血小板濃厚血漿及びカルシウム含有化合物、の混合物が血小板濃厚血漿の凝固及びマトリックスの形成を確保するための条件下に維持される、
- 方法。

【請求項25】 カルシウム含有化合物が骨粒子、骨粒子のカルシウム含有添加剤との混合物から成る群から選択される、請求項24の方法。

【請求項26】 凝固が酸素の存在下で、実質的に攪拌せずに実施される、請求項24の方法。

【請求項27】 凝固のために使用されたトロンビン産生用組み換え化合物が組み換えトロンボプラスチンである、請求項24の方法。

【請求項28】 カルシウム含有化合物が骨粒子、骨粒子のカルシウム含有添加剤との混合物から成る群から選択され、そして少なくとも1種のリン脂質が組み換えトロンビン産生用化合物、血小板濃厚血漿及び骨粒子の混合物、並びに血小板濃厚血漿及び骨粒子の混合物、から成る群から選択された混合物に添加される、請求項24の方法。

【請求項29】 トロンビン産生用組み換え化合物がリン脂質と組み合わせられている、請求項24の方法。

【請求項30】 トロンビン産生用組み換え化合物が、ホスファチジルセリン、その誘導体、少なくとも1個の脂肪酸側鎖をもつホスファチジルセリン、ホスファチジルコリン、その誘導体、及び少なくとも1個の脂肪酸側鎖をもつホスファチジルコリン及びそれらの混合物、から成る群から選択された少なくとも1種のリン脂質と組み合わせられる、請求項24の方法。

【請求項31】 トロンビン産生用組み換え化合物が、ホスファチジルセリン、その誘導体、少なくとも1個の脂肪酸側鎖をもつホスファチジルセリン、ホスファチジルコリン、その誘導体、及び少なくとも1個の脂肪酸側鎖をもつホスファチジルコリン及びそれらの混合物、から成る群から選択された少なくとも1種のリン脂質と組み合わせられ、前記脂肪酸側鎖が少なくとも1個の二重結合及び6～24炭素原子をもつ脂肪酸鎖から成る群から選択される、請求項24の方法。

【請求項32】 トロンビン産生用組み換え化合物が、ホスファチジルセリン、その誘導体、少なくとも1個の脂肪酸側鎖をもつホスファチジルセリン、ホスファチジルコリン、その誘導体、及び少なくとも1個の脂肪酸側鎖をもつホスファチジルコリン及びそれらの混合物、から成る群から選択された少なくとも1種のリン脂質と組み合わせられ、前記脂肪酸側鎖が少なくとも1個の二重結合及び16～18炭素原子をもつ脂肪酸鎖から成る群から選択される、請求項24の方

法。

【請求項33】 トロンビン産生用組み換え化合物が、少なくとも2種のリン脂質の混合物と組み合わせられ、そこで、第1のリン脂質が、ホスファチジルセリン、その誘導体、少なくとも1個の脂肪酸側鎖をもつホスファチジルセリン及びそれらの混合物から成る群から選択され、少なくとも1個の脂肪酸側鎖をもつホスファチジルセリンの脂肪酸側鎖が、少なくとも1個の二重結合及び6～24炭素原子をもつ脂肪酸鎖から成る群から選択され、他方、第2のリン脂質が、ホスファチジルコリン、その誘導体、及び少なくとも1個の脂肪酸側鎖をもつホスファチジルコリン及びそれらの混合物、からなる群から選択され、少なくとも1個の脂肪酸側鎖をもつホスファチジルコリンの脂肪酸側鎖が、少なくとも1個の二重結合及び6～24炭素原子をもつ脂肪酸鎖から成る群から選択される、請求項24の方法。

【請求項34】 カルシウム含有化合物が骨粒子、カルシウム含有添加剤との骨粒子の混合物、から成る群から選択され、そして骨粒子が、脳顔面頭蓋の骨粒子、腸骨の粒子及びそれらの混合物から成る群から選択された骨粒子である、請求項24の方法。

【請求項35】 カルシウム含有化合物が、骨粒子、骨粒子のカルシウム含有添加剤との混合物から成る群から選択され、そして骨粒子が非変性骨の粒子である、請求項24の方法。

【請求項36】 カルシウム含有化合物が、骨粒子、骨粒子のカルシウム含有添加剤との混合物から成る群から選択され、そして骨粒子が0.5mmと5mmの間を含んで成る平均粒度をもつ、請求項24の方法。

【請求項37】 カルシウム含有化合物が骨粒子、カルシウム含有添加剤との骨粒子の混合物から成る群から選択され、血小板濃厚血漿に添加された骨粒子の量が、血小板濃厚血漿及び骨粒子の混合物の約15%～50容量%に相当する、請求項24の方法。

【請求項38】 血小板濃厚血漿が、マトリックス形成剤1マイクロリットル当たり1,500,000～2,000,000個の血小板濃度をもつ、請求項24の方法。

【請求項39】 血小板濃厚血漿、骨粒子及び組み換えトロンビン産生用化合物の混合物が、骨粒子を含まない混合物1マイクロリッター当たり1,500,000~2,000,000個の血小板濃度を持ち、骨粒子を含まない混合物1マイクロリッター当たり0.05~0.4 μ gの乾燥形態のトロンボプラスチンを含む、請求項24の方法。

【請求項40】 血小板濃厚血漿が患者の血漿、患者と組織適合性の血漿及びそれらの混合物から成る群から選択された血漿から調製され、本質的に、カルシウム含有化合物が患者の骨、患者と組織適合性の骨及びそれらの混合物から成る群から選択された少なくとも1種の骨から調製された骨粒子から成る、患者のための骨産生製品の調製のための、請求項24の方法。

【請求項41】 PRPの凝固が抗破骨細胞作用をもつ抗生物質の存在下で産生される、請求項24の方法。

【請求項42】 血小板濃厚血漿及び、骨産生を誘発するために有効量のカルシウム含有化合物からの骨産生製品の調製のための、少なくとも1種のリン脂質及び抗破骨細胞作用をもつ少なくとも1種の抗生物質と混合して、トロンビン産生用組み換え化合物の使用。

【請求項43】 トロンビン産生用組み換え化合物、少なくとも1種のリン脂質及び、抗破骨細胞作用をもつ少なくとも1種の抗生物質を含み、抗生物質／トロンビン産生用組み換え化合物の重量比が1より大きい混合物。

【請求項44】 抗破骨細胞作用をもつ抗生物質／トロンビン産生用組み換え化合物の重量比が5より大きい、請求項43の混合物。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61L24/10 A61L26/00		International Application No. PCT/BE 00/00152
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61L A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97 29792 A (COHESION CORP.; SIERRA DAVID H (US)) 21 August 1997 (1997-08-21) column 7, line 10 - line 24	1-58
X	US 4 427 650 A (STROETMANN MICHAEL) 24 January 1984 (1984-01-24) example 5 claims 1,9	1,8, 11-14,56
A	US 5 266 624 A (PROSISE WILLIAM E ET AL) 30 November 1993 (1993-11-30) claims 1,2,5,10	1,11,15, 34,51, 52,56
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claims, or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later documents published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "S" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 18 May 2001		Date of making of the international search report 29/05/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patenthaus 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Heck, G.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Informal Application No
 PCT/BE 00/00152

G.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 883 078 A (TURECEK PETER ET AL) 16 March 1999 (1999-03-16) column 5, line 11 - line 42 claims 1,2,8	1,11,15, 34,51, 52,56
A	WO 99 45938 A (SIERRA DAVID H; BIOSURGICAL CORP (US)) 16 September 1999 (1999-09-16) claims 1,3-5,12,13	1,11,15, 34,51, 52,56
A	US 5 733 545 A (HOOD III ANDREW G) 31 March 1998 (1998-03-31) cited in the application example 4	15,34, 51,52,56

Form PCTISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internat. Application No.

PCT/BE 00/00152

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9729792 A	21-08-1997	CA 2247133 A EP 0885020 A	21-08-1997 23-12-1998
US 4427650 A	24-01-1984	AT 20824 T AT 13810 T DE 3171072 D DE 3175003 D EP 0068047 A EP 0068048 A EP 0068149 A JP 1018054 B JP 58038216 A JP 1018055 B JP 58038217 A JP 58036545 A JP 61039824 B JP 61178927 A US 4427651 A US 4442655 A	15-08-1986 15-07-1985 25-07-1985 28-08-1986 05-01-1983 05-01-1983 05-01-1983 03-04-1989 05-03-1983 03-04-1989 05-03-1983 03-03-1983 05-09-1986 11-08-1986 24-01-1984 17-04-1984
US 5266624 A	30-11-1993	NONE	
US 5883078 A	16-03-1999	DE 19521324 C CA 2178789 A EP 0748633 A JP 9002971 A	31-10-1996 13-12-1996 18-12-1996 07-01-1997
WO 9945938 A	16-09-1999	AU 2900599 A EP 1061931 A	27-09-1999 27-12-2000
US 5733545 A	31-03-1998	AU 710720 B AU 5416696 A CA 2214274 A EP 0813427 A JP 11502435 T NO 9627397 A	30-09-1999 23-09-1996 12-09-1996 29-12-1997 02-03-1999 12-09-1996

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY,
DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I
T, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF
, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, G
M, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ
, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ,
MD, RU, TJ, TM), AE, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, C
H, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE
, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, K
P, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU
, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, S
G, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ
, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW